مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۱، سال ۱۳۸۳ (۹۲-۸۵)

تراریختی چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) با آگروباکتریوم ریزوژنز برای مطالعه بیان ژن در ریشه‌های مویین

پیمان نوروزی[۱]، تیم تورا[۲]، دگوان کای[۳]، بهمن یزدی صمدی[٤]، محمد علی ملبوبی[٥]
۱، استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج ۲، ۳، استادیار و استاد موسسه اصلاح نباتات دانشگاه کیل آلمان
٤، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ٥، محقق مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/٤/۱۸

خلاصه

در این تحقیق، با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز، ریشه مویین چغندرقند تراریخته تولید گردید. در حین این مطالعه، تاثیر پروموتر جداسازی شده از آرابیدوپسیس تالیانا (پروموتر AT) که با پروموتر *Hs1^pro-1^* ژن مقاومت به نماتد درچغندر مشابهت زیادی دارد، بر روی بیان ژن گزارشگر در مقایسه با پروموتر CaMV35S نیز مطالعه گردید. همچنین به عنوان کنترل منفی، ریشه‌های مویین با آگروباکتریوم ریزوژنز فاقد ناقل دوگانه القاء شدند. سپس ریشه‌های مویین حاصل از تراریختی با روش‌های PCR و دورگ سازی سادرن مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت انتخاب شده برای بررسی الگوی بیان ژن در معرض لارو نماتد قرار گرفتند. پس از ۱۰ روز کلیه ریشه‌های مویین با رنگ آمیزی GUS ارزیابی شدند. نتایج نشان دادکه ریشه‌های مویین واجد پروموتر AT الگویی مشابه از نظر رنگ‌آمیزی با ریشه‌های مویین واجد پروموتر CaMV35S دارند. بنابراین به نظر می‌رسد پروموترAT علی‌رغم مشابهت زیاد با پروموتر القایی ژن *Hs1^pro-1^* ، حالت القایی نداشته و رنگ GUS در تمامی قسمت‌های ریشه مویین به خصوص در ناحیه مریستمی و دور از محل سیست‌های نماتد نیز مشاهده گردید. در نتیجه پروموترAT مانند یک پروموتر ذاتی عمل نموده است.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم ریزوژنز، پروموتر، ریشه های مویین، ژن GUS

مقدمه

برای آزمون های تراریختی[۱] گیاه بوسیله باکتری میتوان از آگروباکتریوم تومه‌فاسینس[۲] و آگروباکتریوم ریزوژنز[۳] استفاده نمود. از آگروباکتریوم ریزوژنز معمولا زمانی استفاده می شود که نیازی به باززایی گیاه کامل نبوده و تنها اثر یک ژن انتقالی و وضعیت بیان آن در سلول گیاهی مورد بررسی قرار گیرد. بسیاری از گونه‌های گیاهی به آگروباکتریوم ریزوژنز حساس می‌باشند و تلقیح آنها با این باکتری منجر به القای ریشه های مویین می گردد. این ریشه ها در اثر تلفیق بخشی از DNA پلاسمید القا کننده ریشه[۴] به درون ژنوم گیاه به وجود می‌آیند (۱). ریشه‌های مویین می‌توانند به سادگی در محیط‌های فاقد هورمون گیاهی کشت شده و به عنوان بستری برای مطالعه پاتوژن‌های اجباری ریشه همچون قارچ‌ها و نماتدها استفاده گردند. برای مثال کشت ریشه مویین برای مطالعه بیولوژی قارچ پلی‌میکسا بتا[۵] (۸)، پلاسمودیافورا براسیکا[۶] (۸)و برای مطالعه تولیدمثل نماتد سیستی[۷] و بیان مقاومت به نماتد چغندرقند در ریشه‌های مویین به کار رفته‌اند (۹). همچنین تلفیق پایدار و بیان ژن پروتئین پوششی ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر[۸] در ریشه‌های مویین چغندر قند نشان داده شده است (۴). لذا ملاحظه می‌شود که می‌توان از این سیستم برای انجام

مکاتبه کننده: پیمان نوروزی

1.Transformation
2 .Agrobacterium tumefaciens
3 .Agrobacterium rhizogenes
4 . Root inducing (Ri)
5 . Polymyxa betae
6 . *Plasmodiaphora brassica*
7 . *Heterodera schachtii*
8 . *Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)*

بسیاری از آزمون‌های زیستی ، به ویژه در ارتباط با بیان ژن یا تکثیر ویروس در ریشه بهره جست. در این آزمون‌ها اگرچه مرفولوژی و فیزیولوژی سیستم ریشه به طور قابل ملاحظه‌ای تغییر می‌یابد ولی تا حد زیادی مسائل زیستی، قابل آزمون و بررسی است. تلقیح بافت‌های چغندرقند با آگروباکتریوم ریزوژنز منجر به تولید ریشه‌های مویین می‌شود. چنین ریشه‌هایی فاقد نیاز هورمونی بوده و به سرعت تکثیر و منشعب می‌گردند و می‌توان به مقادیر زیاد در زیرکشت‌های متوالی از آنها تهیه نمود (۳، ۱۲). تراریختی چغندر قند با آگروباکتریوم ریزوژنز به طور موفقیت‌آمیزی برای تشخیص اولین ژن مقاومت به نماتد *Hs1*$^{pro-1}$ در چغندر قند به کار رفته است (۲).

در این تحقیق، ژن GUS تحت کنترل پروموتر AT [1]حاصل از آرابیدوپسیس تالیانا[2] و پروموتر CaMV35S به صورت جداگانه توسط آگروباکتریوم ریزوژنز به چغندرقند منتقل شده و تاثیر تلقیح ریشه‌های مویین با نماتد بر فعالیت پروموترهای مذکور بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سویه آگروباکتری و ناقلین پلاسمیدی

با توجه به آنکه این تحقیق در آلمان صورت گرفت از رقم تجارتی ۹۳۱۶۱p حساس به نماتد چغندر قند که درشمال این کشور کشت می‌شود برای تراریختی استفاده گردید. بذوردر گلخانه کشت شده و پس از ۸ هفته از دمبرگ گیاهچه‌ها به عنوان ریزنمونه برای تراریختی با آگروباکتریوم ریزوژنز AR15834 حامل پلاسمید کمکی نوع وحشی pi15834 استفاده گردید. ناقلین دوگانه به صورت مستقل به درون آگروباکتری منتقل شدند. اولین ناقل دوگانه pAM194 بود که با ورود ژن GUS دارای اینترون درون ناحیه برش *Hind*III پلاسمید pRT104 (۱۵) تحت کنترل پروموتر CaMV35S تهیه شده بود. دومین پلاسمید pMOG/AT با ورود یک پروموتر از آرابیدوپسیس تالیانا به درون ناحیه برش *Xba*I، *Xho*I در پلاسمید pMOG819 ساخته شده بود. کلیه مراحل ساخت پلاسمید برطبق روش‌های مولکولی انجام گرفت(۱۱). سپس پلاسمید نوترکیب توسط باکتری *E.coli* تکثیر شد.

1 . Promoter

2 . *Arabidopsis thaliana*

تراریختی آگروباکتری

روش انجماد و ذوب[3] برای ورود هریک از پلاسمیدها به درون آگروباکتریوم ریزوژنز سویه ۱۵۸۳۴ به طور جداگانه استفاده شد(۱۱). در این روش از کلرید کلسیم به همراه شوک حرارتی برای انتقال پلاسمید درون آگروباکتری استفاده می گردد.

تلقیح و کشت توام بافت گیاهی

سلول‌های آگروباکتریوم ریزوژنز حامل ناقل‌های دوگانه در ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و کانامایسین بر روی شیکر دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای $^{\circ}C$ ۳۰-۲۸ کشت شبانه شدند. سپس این کشت در ۳۵۰۰ دور در $4^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب سلول‌ها در ۵ برابر حجم LB تعلیق شدند. این سوسپانسیون برای تلقیح ریزنمونه های دمبرگ به کار رفت. برای این کار ابتدا بافت‌های گیاهی در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده سپس با آب مقطر استریل برای ۳ بار، هربار ۱۰ دقیقه شستشو شدند. سپس ریزنمونه‌ها به قطعات ۲-۱ سانتی‌متری بریده شده و در سوسپانسیون باکتری به مدت ۵ دقیقه تلقیح شدند. ریزنمونه‌ها با کاغذ صافی خشک شده تا باکتری‌های اضافی از سطح آنها جدا گردد. در این مرحله ریزنمونه‌ها به محیط جامد B5 (۶) نصف غلظت منتقل و در $^{\circ}C$ ۲۳ تحت تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی برای ۲ روز نگه داری شدند. پس از ۲ روز کشت توام، ریزنمونه‌ها به محیط مشابه با ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند تا در این محیط ضمن القای ریشه‌های مویین، باکتری‌ها از محیط حذف گردند. پس از یک تا دو هفته ریشه‌های مویین ظاهر شده و به محیط مشابه در شرایط تاریکی و در زیرکشت‌های بعدی به محیط مشابه با ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم منتقل شدند.

استخراج DNA ژنومی از ریشه‌های مویین

محلول های لازم

ابتدا محلولهای مورد نیاز طبق جدول ۱ تهیه گردید:

3 . Freeze- thaw method

جدول ۱- محلول‌های مورد نیاز در مراحل مختلف استخراج DNA

2xCTAB	بافر استخراج اول	بافر شستشوی دوم	
Tris/HCL (pH=7.5)	120 mM	Ethanol 76%	Ethanol 76%
NaCl	840 mM	NaOAc 0.2 M	NH4OAc 0.01M
EDTA (pH=8)	12 mM		
CTAB	2 %		

سپس استخراج DNA ژنومی ریشه‌های مویین MOG/AT با استفاده از CTAB بر طبق روش کای و همکاران (۲) به شرح زیر انجام گرفت:

۲۰۰ میلی‌گرم بافت ریشه از هر نمونه در نیتروژن مایع آسیاب شد. به هر نمونه یک میلی‌لیتر بافر 1.2xCTAB و ۱۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول افزوده شده و پس از مخلوط کردن در حمام آب گرم ۶۵°C به مدت یک ساعت نگه داری شدند. سپس به هر نمونه ۶۰۰ میکرولیتر کلروفورم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. پس از سانتریفوژ در ۸۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط، فاز رویی به تیوپ جدید منتقل گردید. برای رسوب دادن DNA از ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد و سپس سانتریفوژ ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴°C استفاده گردید. رسوب DNA با بافر شستشوی یک به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط و سپس با بافر شستشوی دو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط شستشه شده و پس از سانتریفوژ در ۴°C ، ۱۰ دقیقه و۱۰۰۰۰ دور در دقیقه وسپس حذف روشناور، رسوب DNA در دمای محیط به مدت ۱۰ تا۲۰ دقیقه خشک شده و نهایتا در حجم مناسبی از بافر TE حل و در یخچال۴°C نگهداری گردید.

آزمون PCR

برای تایید مولکولی ریشه‌های مویین تراریخته[1] MOG/AT، ابتدا از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن GUS استفاده گردید.

Forward Primer : 5' – CCTGTAGAAACCCCAACCCG – 3'

Reverse Primer : 5'– CGGATGCCGACGCGAAGCGG – 3'

بدین ترتیب پس از ۳۵ سیکل [یک دقیقه ۷۲°C → یک دقیقه ۵۵°C → یک دقیقه ۹۴°C] قطعه‌ای از ژن GUS بین دو آغازگر تکثیر شده و محصول PCR درون ژل آگارز یک درصد تزریق گردید.

1 . Transformed

دورگ‌سازی سادرن

برای تایید ورود T-DNA پلاسمید pMOG/AT و تعداد نسخه‌های آن در ژنوم سلول‌های ریشه مویین، آزمون دورگ‌سازی سادرن با کمک قطعه‌ای از ژن GUS، به عنوان کاوشگر انجام گرفت. برای این منظور ۳ میکروگرمDNA ژنومی ریشه‌های مویین PCR مثبت با آنزیم *Eco*RI برش یافتند. محصولات حاصل از برش در ژل یک درصد آگارز قطعات برش یافته تفکیک شدند. با قراردادن ژل بر روی ظرف حاوی محلول ۰/۲۵ مولار NaOH و ۱/۵ مولار NaCl عمل انتقال DNA از ژل به غشاء نایلونی Hybond-N+ به روش کاپیلاری در طی شب صورت گرفت. قطعه کاوشگر حاصل از ژن GUS با α-^{32}p-dATP و α-^{32}p-dCTP طبق روش فین برگ و وگل اشتاین (۱۹۸۳) نشان‌دار شد. دورگ سازی بلات با کاوشگر نشان‌دار شده در دمای ۶۰°C و مراحل شستشو و تشخیص نوارها طبق روش پیلن و همکاران (۱۹۹۲) انجام گرفت.

تلقیح ریشه‌های مویین با نماتد

از هر یک از نمونه‌های ریشه مویین که نتایج PCR و سادرن آنها مثبت بود، ۲ قطعه ریشه جوان ۲-۱ سانتیمتری جدا شده و در دوپلیت کشت قرار گرفتند. تلقیح بافت‌های ریشه مویین در هرپلیت با ۳۰۰ لارو نماتد چغندرقند بر طبق روش سیجمون و همکاران (۱۹۹۱) انجام گرفت.

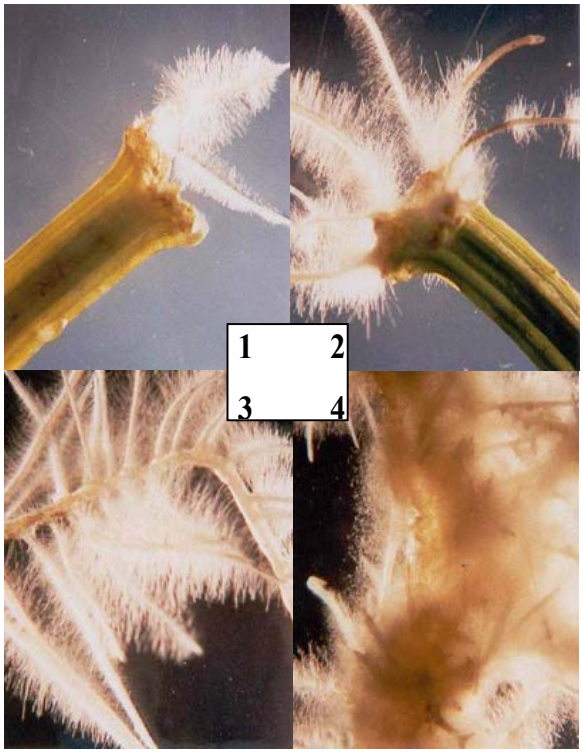
آزمون GUS

رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی ریشه‌های مویین به منظور تعیین فعالیت GUS، ۱۰ روز پس از تلقیح ریشه‌ها با لارو نماتد و ظهور سیست‌های نماتد بر طبق روش جفرسون(۱۹۸۷) با تغییرات زیر صورت گرفت. بدین ترتیب که در محلول رنگ آمیزی از بافر تریس ۱۰۰ میلی مولار و کلرید سدیم ۵۰ میلی مولار و بدون تریتون استفاده گردید. برای رنگ آمیزی، بر روی ریشه‌های هر نمونه در زیر هود، ۲-۱ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی GUS فیلتراستریل شده اضافه نموده و ظروف کشت به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷°C نگه داری شدند. سپس با استفاده از استرئومیکروسکوپ، محل تشکیل لکه‌های آبی در ریشه‌های مویین بررسی گردید.

نتایج و بحث

تراریختی گیاه

ریزنمونه‌های گیاهی تلقیح شده با آگروباکتریوم ریزوژنز پس از ۲ هفته تولید ریشه‌های مویین نمودند. این ریشه‌ها معمولا از دو انتهای ریزنمونه تولید شده و معمولا چند ریشه مویین مستقل از هم که هریک از یک سلول جداگانه منشا گرفته بودند تولید می‌گردید. این ریشه‌ها به تدریج رشد کرده و پس از یک ماه تمام سطح پلیت را می‌پوشاندند. مراحل مختلف القای ریشه مویین و رشد و تکامل آن در شکل‌های ۱ تا ۴ مشخص است. رشد ریشه‌ها بر روی محیط فاقد هورمون نشان داد که این ریشه‌ها حداقل واجد T-DNA مربوط به پلاسمید القاء کننده ریشه موجود در آگروباکتریوم ریزوژنز هستند. کشت‌های ریشه حاصل از سه تراریختی جداگانه با آگروباکتریوم ریزوژنز فاقد ناقل دوگانه، واجد پلاسمید pAM194 و پلاسمید pMOG/AT پس از یک ماه تولید ریشه‌های جانبی فراوان نموده و رشد متراکمی را نشان دادند.



شکلهای ۱ تا ۴- ریشه‌های موئین حاصل از تراریختی جدا کشت دمبرگ گیاهچه رقم 93161p چغندرقند پس از تلقیح با آگروباکتریوم ریزوژنز، ۱۵ روز پس از زمان تلقیح (شکل ۱). ۲۰ روز پس از زمان تلقیح (شکل ۲) ۲۵ روز پس از زمان تلقیح (شکل ۳) و ۳۰ روز پس از زمان تلقیح (شکل ۴)

PCR

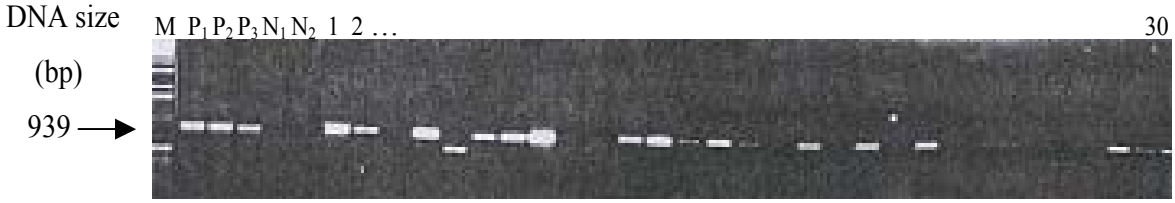
پس از انجام PCR برای ۳۰ نمونه DNA ژنومی ریشه‌های مویین حاصل از تراریختی با آگروباکتریوم ریزوژنز حامل پلاسمید pMOG/AT با آغازگر اختصاصی ژن GUS، تعداد ۱۸ نمونه نوار مورد انتظار (۹۳۹ جفت باز) را نشان دادند به عبارتی ۶۰ درصد ریشه‌های مویین MOG/AT ، توانسته‌اند T-DNA حاوی ژن گزارشگر و پروموتر موردنظر را دریافت نمایند (شکل ۵).

دورگ‌سازی سادرن

نتایج سادرن بلات نشان داد که تعداد نسخه‌های T-DNA در ریشه‌های مویین تراریخته بین ۱ تا ۸ نسخه متغیر بوده و ۵۰ درصد نمونه‌ها بیش از یک نسخه T-DNA دریافت نموده بودند (شکل ۶).

تلقیح ریشه‌های مویین با نماتد و آزمون GUS

بر روی ریشه‌های مویین تلقیح شده بالارو نماتد در هر سه نوع تراریختی با آگروباکتریوم ریزوژنز فاقد ناقل دوگانه، واجد پلاسمید pAM194 ، واجد پلاسمید pMOG/AT (GUS با پروموتر AT) پس از ۱۰ روز، تعدادی سیست نماتد تشکیل گردید که با استرئو میکروسکوپ قابل رویت بودند (شکل‌های ۸ -۷). در این آزمایش همچنین یک نمونه ریشه مویین تراریخته MOG/AT بدون تلقیح با نماتد به عنوان شاهد به کار رفت. پس از رنگ‌آمیزی کلیه نمونه‌ها با محلول رنگ‌آمیزی GUS، مشاهده گردید که لکه‌های آبی رنگ نه تنها در ریشه‌های تراریخته پروموترS-GUS 35 و پروموترAT-GUS تلقیح شده با نماتد با الگویی مشابه دیده می‌شوند بلکه در نمونه کنترل AT-GUS پروموتر بدون تلقیح با نماتد نیز لکه‌های آبی رنگ دیده می‌شود (شکل‌های ۱۲-۹). تورا و همکاران (۲۰۰۱) مجموعه‌ای از سازه‌ها تهیه نمودند که در آنها بخش‌های متفاوتی از توالی پروموتر ژن $Hs1^{pro-1}$ حذف شده و در مجاورت ژن گزارشگر GUS اتصال یافته بودند. این سازه های ژنی به آگروباکتریوم ریزوژنز منتقل شدند و در تراریختی چغندرقند و آرابیدوپسیس تالیانا بکار رفتند. سپس ریشه های مویین تراریخته با لارو نماتد تلقیح شدند. نتایج نشان داد که یک توالی ۱۵۰۰ جفت بازی از $Hs1^{pro-1}$ قادر به بیان ژن GUS در محل اتصال نماتد به ریشه گیاه است. بیان ژن $Hs1^{pro-1}$ در گیاهان مقاوم عمدتا در ریشه صورت می‌گیرد و در زمان



شکل ۵- تشخیص ژن GUS با آغازگرهای اختصاصی در ریشه‌های موئین تراریخته چغندرقند توسط PCR

M- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)

P2 - محصول PCR از پلاسمید pMOG/AT (دومین کنترل مثبت)

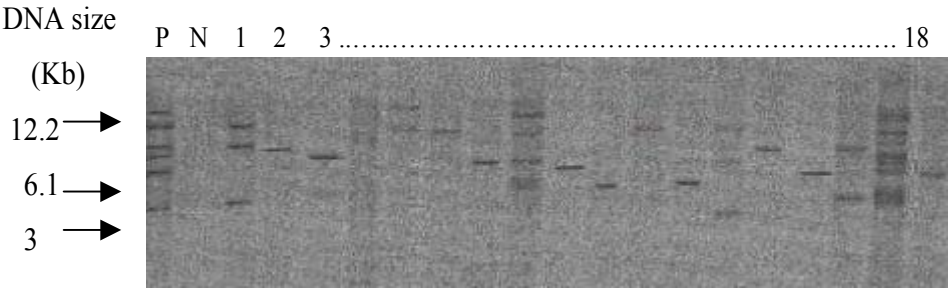
N1 - محصول PCR از DNA ژنومی ریشه موئین تراریخته با آگروباکتریوم ریزوژنز فاقد پلاسمید دوگانه (اولین کنترل منفی)

1-30- محصولهای PCR از DNA ژنومی ریشه‌های موئین مستقل حاصل از تراریختی با واسطه آگروباکتریوم ریزوژنز حامل پلاسمید pMOG/AT

P1- محصول PCR برای پلاسمید pAM194 (اولین کنترل مثبت)

P3- محصول PCR از DNA ژنومی ریشه موئین تراریخته با pAM194 (سومین کنترل مثبت)

N2 - محصول PCR از Master Mix بدون DNA (دومین کنترل منفی)



شکل ۶- نتایج آزمون دورگ سازی سادرن ریشه‌های موئین حاصل از تراریختی جدا کشت دمبرگ رقم ۹۳۱۶۱pچغندر قند با آگروباکتریوم ریزوژنز حامل پلاسمید pMOG/AT.

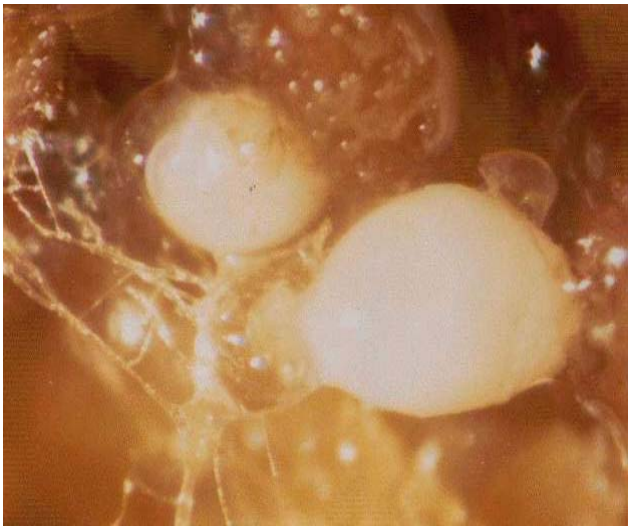
M - نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)

P - DNA ژنومی ریشه موئین تراریخته چغندرقند واجد ژن GUS (کنترل مثبت)

N - DNA ژنومی ریشه موئین تراریخته چغندرقند فاقد ژن GUS (کنترل منفی)

1-18 - DNA ژنومی ریشه‌های موئین تراریخته چغندرقند که نتایج PCR آنها مثبت بوده است . ۵۰ درصد از ریشه‌های موئین بیش از یک نسخه T-DNA دریافت کرده‌اند.

شکل ۷- سیست‌های نماتد تشکیل شده بر روی ریشه‌های موئین ۱۰ روز پس از تلقیح با لارو نماتد چغندرقند



شکل ۸- دو سیست نماتد از شکل ۷ با بزرگ‌نمائی بیشتر

شکل ۹- ریشه‌های موئین تراریخته حامل ژن GUS با پروموتر 35S که بالارو نماتد تلقیح شده و پس از ۱۰ روز رنگ آمیزی GUS شده‌اند. لکه‌های آبی در ریشه‌های موئین بیان ژن GUS را نشان می‌دهند.

شکل ۱۰- ریشه‌های موئین تراریخته حامل ژن GUS با پروموتر AT حاصل از آربیدوپسیس تالیانا که با لارو نماتد تلقیح شده و پس از ۱۰ روز رنگ آمیزی GUS شده‌اند. لکه‌های آبی در ریشه‌های موئین بیان ژن GUS را نشان می‌دهند.

شکل۱۱- ریشه‌های موئین تراریخته حامل ژن GUS با پروموتر AT آربیدوپسیس تالیانا بدون تلقیح با نماتد پس از رنگ آمیزی GUS (به عنوان شاهد)لکه‌های‌آبی بیان ژنGUSدر ریشه‌های موئین را نشان می‌دهد.

شکل ۱۲- ریشه‌های موئین فاقد ژن GUS تلقیح شده با لارو نماتد که پس از ۱۰ روز رنگ‌آمیزی GUS شده‌اند. رنگ آبی در ریشه‌های موئین دیده نمی‌شود.

آلودگی به نماتد، بیان این ژن افزایش می یابد. این امر نشان دهنده اثر متقابل پروموتر $Hs1^{pro-1}$ و نماتد است. در حالی که نتایج تحقیق ما نشان داد که توالی پروموتری AT جداسازی شده از آرابیدوپسیس تالیانا، پس از تراریختی به گیاه چغندرقند و آلوده سازی ریشه با لارو نماتد نتوانست بیان القایی ژن را تایید نماید. به طوری که در تمام قسمت های ریشه پس از رنگ آمیزی GUS، لکه های آبی رنگ مشاهده گردید. این امر نشان می دهد که توالی های خاصی از پروموتر $Hs1^{pro-1}$ باعث القایی شدن بیان ژن مجاور آنها می گردد. بنابراین پروموترAT جداسازی شده از آرابیدوپسیس تالیانا علی‌رغم شباهت زیاد با توالی پروموتر القایی ژن $Hs1^{pro-1}$ چغندر حالت القایی نداشته بلکه بیان مداوم یا ذاتی[1] داشته و مانند پروموتر CaMV35S عمل می‌نماید.

1 . Constitutive

REFERENCES

1. Bevan, M.W. & M.D. Chilton. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. Annu. Rev. Genet. Vol.16: 357-384.
2. Cai, D., M. Kleine, S. Kifle, H.J. Horloff, N.N. Sandal, K.A. Marcker, R.M.K Lankhorst, E.M.J. Salentijn, W. Lange, W.J. Stiekema, V. Wyss, F.M.W. Grundler & C. Jung. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet. Science. Vol. 275: 832-834.

3. Damgard, O. & O. Rasmussen. 1991. Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyl infections with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Mol Biol. Vol.17: 1-8.
4. Ehlers, U., U. Commandeur, R. Frank, J. Landsmann, R. Koeing, & W. Burgermeister. 1991. Cloning of coat the protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugarbeet hairy roots. Theor. Appl. Genet. Vol.81: 777-782.
5. Feinberg, A.P. & B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem. Vol.132: 6-13.
6. Gamborg, O.L. & R.A. Miller. 1968. Nutrient requirements of suspansion culture of soybean root cells. Exp Cell Res. Vol.50: 151-158.
7. Jefferson, R.A., T.A. Karanagh, & M.W. Beran. 1987.GUS fusions : β – glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal. Vol.6: 3901-3907.
8. Mugnier, J. 1987. Infection by *polymyxa betae* and *plasmodiophora brassicae* of roots containing root-inducing transferred DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. Phytopathology. Vol.77: 539-542.
9. Paul, H., J.E.M. Deelen, B. Henken, T.S.M.Bock, W. Lange, & F.A. Krens. 1990. Expression in vitro of resistance to *Heterodera shachtii* in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of *Beta vulgaris*, transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Euphytica. Vol.48: 153-157.
10. Pillen, K., G. Steinrucken, G.Wricke, R.G. Herrmann, & C. Jung. 1992. A linkage map of sugarbeet (Beta vulgaris L.). Theor. Appl. Genet. Vol.84: 129-135.
11. Sambrook, J., T. Maniatis, & E.F. Fritsch. 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. Shahin, E., K. Sukhapinda, R. Simpson, & R. Spivey. 1986. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri plasmid T-DNA. Theor. Appl. Genet. Vol.72: 770-777.
13. Sijmons, P.C., F.M.W. Grundler, N. Mende, P.R.Burrows, & U. Wyss. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. Plant Journal. Vol.1: 245-254.
14. Thurau, T., D. Cai, & C. Jung. 2001. Functional analysis of the $Hs1^{pro-1}$ promoter. Research project seminar. Crop Science and Plant Breeding Institute. Kiel university. Kiel. Germany. Nov 7.
15. Topfer, R., V. Matzeit, B. Gronenborn, J. Schell, & H.H.Steinbiss. 1987. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucleic Acids Res. Vol.14: 5890.

Agrobacterium rhizogenes Mediated Transformation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) for Studying Gene Expression in Hairy Roots

P. NOROUZI[1], T. THURAU[2], D. CAI[3], B. YAZDI-SAMADI[4] AND M. A. MALBOOBI[5]

1, Assistant Professor, Sugar Beet Seed Institute, Karaj, 2, 3, Assistant Professor and Professor, Plant Science&Plant Breeding Institute, Kiel University, Germany, 4, Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, 5, Assistant Professor, National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Accepted July. 9, 2003

SUMMARY

In this research, sugarbeet transformed hairy root was produced by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Effect of a promoter (AT) derived from *Arabidopsis thaliana* was compared with CaMV35S promoter for expression of one reporter gene. AT promoter was very similar to $Hs1^{pro-1}$ promoter that is responsible for nematode resistance in sugar beet. As a negative control, hairy roots were induced to *Agrobacterium rhizogenes* without binary vector. Then, hairy roots were analyzed by PCR and Southern hybridization. Positive hairy roots were selected and inoculated with nematode larvae. After 10 days, hairy roots were stained by GUS assay. The results indicated that hairy roots harboring AT promoter, have similar staining pattern to hairy roots harboring CaMV35S promoter. Therefore, it seems AT promoter although having much similarity to $Hs1^{pro-1}$ inducing promoter, isn't an inducing one, so that GUS stain spots could be observed in all parts of hairy root specially in meristemic zone and far from nematode cyst site. In conclusion, AT promoter has been found to have acted as a constitutive promoter.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, Promoter, Hairy roots, Gus gene.